

507,414  
10/507414(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2003 年 11 月 6 日 (06.11.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/091444 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12P 7/62, C12N 15/09 (74) 代理人: 安富 康男, 外(YASUTOMI, Yasuo et al.); 〒532-0011 大阪府 大阪市 淀川区西中島 5 丁目 4 番 20 号 中央ビル Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/05323
- (22) 国際出願日: 2003 年 4 月 25 日 (25.04.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2002-125881 2002 年 4 月 26 日 (26.04.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 鐘淵化学工業株式会社 (KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒530-8288 大阪府 大阪市 北区中之島 3 丁目 2 番 4 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 宮本 憲二 (MIYAMOTO, Kenji) [JP/JP]; 〒223-0062 神奈川県 横浜市 港北区日吉本町 2 丁目 3-13 日管ハイム第 8101 Kanagawa (JP). 小川 典子 (OGAWA, Noriko) [JP/JP]; 〒655-0872 兵庫県 神戸市 垂水区塩屋町 6 丁目 31-17 Hyogo (JP). 小坂田 史雄 (OSAKADA, Fumio) [JP/JP]; 〒700-0063 岡山県 岡山市 大安寺東町 17-7 Okayama (JP). 松本 圭司 (MATSUMOTO, Keiji) [JP/JP]; 〒663-8023 兵庫県 西宮市 大森町 11-33 Hyogo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF SEPARATING POLY-3-HYDROXYALKANOIC ACID

(54) 発明の名称: ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸の分離方法

(57) Abstract: A process for producing a poly-3-hydroxyalkanoic acid which comprises physically treating a microorganism cell suspension containing the poly-3-hydroxyalkanoic acid to crush the cells while continuously or intermittently adding an alkali to the suspension and then separating out the poly-3-hydroxyalkanoic acid.

(57) 要約:

ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸を含有する微生物菌体の懸濁液の物理的破碎処理を、前記懸濁液にアルカリを連続的又は断続的に添加しながら行った後、ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸を分離することからなる、ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸の製造方法を提供する。

WO 03/091444 A1

## 明細書

## ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸の分離方法

## 技術分野

- 5 本発明はポリ－３－ヒドロキシアルカン酸を、微生物菌体から分離精製する方法に関するものである。

## 背景技術

- ポリ－３－ヒドロキシアルカン酸（以後PHAと称す）は多くの微生物種の細  
10 胞にエネルギー蓄積物質として生成、蓄積される熱可塑性ポリエステルであり、  
生分解性を有している。現在、プラスチック廃棄物は焼却、埋め立てなどにより  
処理されているが、これらの処理方法には地球の温暖化や埋立地の地盤弛緩等の  
問題点がある。そのためプラスチックリサイクルへの社会意識の高まりとともに、  
リサイクルシステム化が進みつつある。しかし、リサイクル可能な用途には限り  
15 があり、実際には、プラスチック廃棄処理方法としては、焼却、埋立、リサイク  
ルだけでは対応しきれず、自然界に放置されたままになるものも多いのが現状で  
ある。そこで、廃棄後は自然界の物質循環に取り込まれ、分解生成物が有害とな  
らないPHAの様な生分解性プラスチックが注目されており、その実用化が切望  
されている。特に、微生物が菌体内で生成蓄積するPHAは、自然界の炭素循環  
20 プロセスに取り込まれることから生態系への悪影響がほとんどないと予想されて  
いる。また、医療分野においても、回収不要のインプラント材料、薬物担体とし  
ての利用が可能と考えられる。

- 微生物が生成するPHAは、通常顆粒体を形成してその微生物の菌体内に蓄積  
されるため、PHAをプラスチックとして利用するためには、微生物の菌体内か  
25 らPHAを分離して取り出すという工程が必要である。PHAを微生物菌体から  
分離精製する既知の方法として、大別すると、PHAが可溶である有機溶媒を用  
いて菌体からPHAを抽出する方法と、PHA以外の菌体構成成分を破碎もしくは  
可溶化させて除くことによりPHAを得る方法に分けられる。

有機溶媒による抽出を利用したPHAの分離精製方法では、PHAが可溶であ

る溶媒として、例えば1, 2-ジクロロエタンやクロロホルムといったハロゲン含有炭化水素を用いて抽出する方法がある（特開昭55-118394号、特開昭57-65193号）。しかし、これらハロゲン含有炭化水素は疎水性溶媒であるため、抽出前に、菌体を予め乾燥する等の、溶媒が菌体中のPHAと接触できるようにするための工程が必要となる。また、これらの方法においてはPHAを5 実用に値する濃度（たとえば5%）以上に溶解すると抽出液は極めて粘重となり、溶解しなかった菌体残渣とPHAを含む溶媒層との分離が非常に困難である。更に、溶媒層からPHAを高い回収率で再沈殿させるためには溶媒層の4～5倍容のメタノールやヘキサン等のPHA不溶性溶媒が必要であるなど、再沈殿工程10 には大容量の容器が必要とされる。さらには、溶媒の使用量が膨大なため、溶媒の回収コストと損失溶媒のコストがかさむことになる。加えて近年、環境保護の観点から有機ハロゲン化合物の使用は制限される方向にあり、この方法での工業化は難しいのが現状である。

そこで、PHAが可溶でありかつ水と混ざり合う溶媒、例えばジオキサン（特15 開昭63-198991号）またはプロパンジオール（特開平02-69187号）またはテトラヒドロフラン（特開平07-79788号）の様な親水性溶媒を用いた抽出方法も提案されている。これらの方法は乾燥菌体や湿菌体からでもPHAを抽出することが可能な点と、菌体残渣と分離した溶媒層を冷却するだけでPHAの沈殿物が得られる点では好ましいと考えられる。しかし、これらの方法20 法でもPHAの溶解した溶媒層の粘重性の問題は解決されておらず、加えて抽出効率を上げるためには加熱が必要であり、水存在下で加熱するためにPHAの加水分解による低分子化が避けられないことや、回収率が劣ることなどの欠点を有している。

一方、PHA以外の菌体構成成分を可溶化させて除くことによりPHAを得る25 方法として、J. Gen. Microbiology, 19, 198-209頁（1958）には、菌体懸濁液を次亜塩素酸ナトリウムで処理してPHA以外の菌体構成成分を可溶化し、PHAを得る方法が記載されている。この方法は、プロセスとしては簡単ではあるが、大量の次亜塩素酸ナトリウムを使用する必要があるためにコストが高くなる。また、PHAの著しい低分子化が引き起こされる

ことや得られたPHA内に無視できない量の塩素が残存することから実用には適さないと考えられる。特公平04-61638号には、PHAを含有する微生物菌体懸濁液を100℃以上で熱処理することで菌体構造を破壊し、次いでタンパク質分解酵素処理と、リン脂質分解酵素処理あるいは過酸化水素処理とを組み合わせ、PHA以外の菌体構成成分を可溶化し、PHAを得る方法が記載されている。この方法は、熱処理によってタンパク質が変性・不溶化するために、次のタンパク質分解酵素処理工程での負荷が増大すること、更には、処理工程が多く複雑であること等の欠点を有している。

また、PHA含有微生物菌体を破砕する方法として、界面活性剤で処理したのち、菌体から放出された核酸を過酸化水素処理して分解し、PHAを分離する方法が提案されている（特表平08-502415号）が、界面活性剤を含む廃液は発泡が激しいことに加えて高いBOD負荷値を持つ。このような観点から界面活性剤の使用は工業的規模において望ましくない。

また、PHA含有微生物菌体を高圧ホモジナイザーで破砕してPHAを分離する方法が提案されている（特開平07-177894号、特開平07-31488号）。しかし、これらの方法は微生物菌体懸濁液を少なくとも3回、場合によっては加温して10回高圧処理をしているが、なおかつ得られるPHAの純度は65～89%程度と低いという欠点がある。また、PHA含有微生物懸濁液にアルカリを添加して加熱し、細胞を破砕してPHAを分離する方法が提案されている（特開平07-31487）。しかし、得られるポリマーの純度は75.1～80.5%と低く、収率向上のためにアルカリ添加量を増やすとポリマーの低分子化が起こるなどの欠点があった。さらに、アルカリ添加後に物理的破砕を行う方法もいくつか提案されているが（Bio separation、2、95-105項、1991、特開平07-31489）、アルカリ処理だけでは菌体構成成分は少量しか菌体外に出ておらず、続く高圧破砕処理後でも菌体構成成分がPHA画分に残存しており効率的でないこと、従って微生物菌体懸濁液を少なくとも5回高圧処理しなければ純度の高いPHAを得ることは出来ず、なおかつ得られるPHAの純度は77～85%程度と低いという欠点がある。加えて、アルカリを添加する方法においては、一般に、微生物菌体から流出する菌体成分、特に

核酸が、菌体懸濁液の粘度を上昇させ、その後の処理が困難になるという問題があった。

また、PHA含有微生物懸濁液をpH2未満の酸性に調整し50度以上でPHAを分離する方法が提案されている（特開平11-266891）。しかし、この方法はpH2未満のような強酸性で処理を行うために工業的規模では望ましくないこと、純度向上のためには酸処理の後にアルカリ性に調整する必要があり大量の塩が発生すること、また、得られるPHAの分子量が247万から100万程度にまで低下するなどの欠点を有している。

## 10 発明の要約

本発明の目的は、従来技術における上記の課題を解決し、PHA含有微生物菌体からPHA以外の菌体構成成分を効率よく除き、少ない工程数で深刻な分子量の低下を起こすことなく高純度のPHAを高収率で得ることのできるPHAの分離精製方法を提供することにある。

- 15 本発明者らは、PHAの工業的に有利な生産方法について鋭意検討した。その結果、（i）PHAを含有する微生物菌体の懸濁液の物理的破碎処理を、前記懸濁液にアルカリを連続的又は断続的に添加しながら行うことによって、微生物菌体から漏洩したPHA以外の菌体構成成分による懸濁液の粘度の向上を防げること、（ii）菌体懸濁液の粘度向上を防ぐことによって懸濁液のpHのコントロールが可能となり、（iii）さらに、懸濁液のpHのコントロールにより、低いアルカリ濃度で処理を行うことが可能となるため、著しい分子量低下を起こすことなく、高純度のPHAが分離できることを見だし、本発明に到達した。

- すなわち本発明は、ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸を含有する微生物菌体の懸濁液の物理的破碎処理を、前記懸濁液にアルカリを連続的又は断続的に添加しながら行った後、ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸を分離することからなる、ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸の製造方法に関する。

その好ましい実施態様としては、上記アルカリの添加は、上記懸濁液のpHをコントロールしながら行う上記製造方法に関し、より好ましくは、上記懸濁液のpHを9～13.5の間にコントロールする上記製造方法に関する。また、上記

懸濁液の物理的破碎処理は、上記懸濁液の攪拌下で行うことが好ましい。さらに、上記懸濁液の物理的破碎処理は、20℃以上40℃未満の温度で行うことが好ましい。

別の好ましい実施態様としては、ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸が、D-3-ヒドロキシヘキサノエート (3HH) と他の3-ヒドロキシアルカン酸との共重合体である上記製造方法、より好ましくは、ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸が、D-3-ヒドロキシブチレート (3HB) とD-3-ヒドロキシヘキサノエート (3HH) との2成分共重合体、または、D-3-ヒドロキシブチレート (3HB) とD-3-ヒドロキシバレレート (3HV) とD-3-ヒドロキシヘキサノエート (3HH) との3成分共重合体である上記製造方法に関する。

また別の好ましい実施態様としては、ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸を含有する微生物が、アエロモナス・キャビエ、あるいは、アエロモナス・キャビエ由来のポリ-3-ヒドロキシアルカン酸合成酵素群遺伝子を導入された菌株である上記製造方法に関する。

以下に本発明を詳述する。

#### 発明の詳細な開示

本発明に用いられる微生物は、細胞内にPHAを蓄積している微生物であれば特に限定されない。例えば、*A. lipolytica*、*A. eutrophus*、*A. latus*等のアルカリゲネス属 (*Alcaligenes*)、シュウドモナス属 (*Pseudomonas*)、バチルス属 (*Bacillus*)、アゾトバクター属 (*Azotobacter*)、ノカルディア属 (*Nocardia*)、アエロモナス属 (*Aeromonas*) の菌等が挙げられる。特に、*A. caviae*等の菌株、更には、PHA合成酵素群の遺伝子を導入した *Alcaligenes eutrophus* AC32 (ブダペスト条約に基づく寄託、国際寄託当局：独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター (茨城県つくば市東1丁目1番3号)、移管日1997年8月7日、受託番号FERM BP-6038、1996年8月12日に寄託された微工研菌寄第P-15786号より移管) (*J. Bacteriol.*, 179, 4821-4830頁 (

1997) ) がより好ましい。本発明においては、これら微生物を適切な条件下で培養して菌体内にPHAを蓄積させた微生物菌体が用いられる。その培養方法については特に限定されないが、例えば特開平05-93049等に挙げられる公知の方法が用いられる。

- 5 本発明におけるPHAとは、ヒドロキシアルカン酸の重合体の総称であり、ヒドロキシアルカン酸成分としては特に限定されないが、具体的には、D-3-ヒドロキシブチレート(3HB)のホモポリマーや、3HBと他の3-ヒドロキシアルカン酸との共重合体、またはD-3-ヒドロキシヘキサノエート(3HH)を含む3-ヒドロキシアルカン酸の共重合体などが挙げられる。なかでもモノマ
- 10 ー成分として3HHを含む重合体、例えば、3HBと3HHとの2成分共重合体(Macromolecules, 28, 4822-4828(1995))または、3HBとD-3-ヒドロキシバレレート(3HV)と3HHとの3成分共重合体(特許第277757号, 特開平08-289797号)が、得られるポリエステル
- 15 の物性の面からより好ましい。ここで3HBと3HHの2成分共重合体を構成する各モノマーユニットの組成比については特に限定されるものではないが、3HHユニットを1~99モル%といった組成比のものが好適である。また、3HBと3HVと3HHとの3成分共重合体を構成する各モノマーユニットの組成比については特に限定されるものではないが、例えば、3HBユニットの
- 20 含量は1~95モル%、3HVユニットの含量は1~96モル%、3HHユニットの含量は1~30モル%といった範囲のものが好適である。

処理される微生物菌体内のPHA含有率は、高い方が好ましいのは当然であり、工業レベルでの適用においては乾燥菌体中に20重量%以上のPHAが含有されているのが好ましく、アルカリ処理、物理的破碎処理、分離操作、分離ポリマーの純度等を考慮すると50重量%以上のPHAが含有されているのが特に好まし

25 い。

本発明における微生物菌体の懸濁液とは、培養終了後の培養懸濁液そのまま、または、培養液から遠心分離等で分離した菌体を水に懸濁させた水性の懸濁液である。ここでの菌体の懸濁濃度は、乾燥菌体換算で500g/l以下が好ましく、さらに好ましくは300g/l以下である。

本発明で使用するアルカリとしては、pHを所定の範囲に調整できるものであれば特に限定されるものではないが、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム等のアルカリ金属水酸化物、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム等のアルカリ金属炭酸塩、炭酸水素ナトリウム、炭酸水素カリウム等のアルカリ金属炭酸水素塩、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム等の有機酸アルカリ金属塩、ホウ砂等のアルカリ金属ホウ酸塩、リン酸3ナトリウム、リン酸水素2ナトリウム、リン酸3カリウム、リン酸水素2カリウム等のアルカリ金属リン酸塩、アンモニア水等が挙げられる。この中でも、工業生産に適し、また価格の点で、水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウム、水酸化カリウムなどが好ましい。アルカリは直接添加してもよいが、水溶液として添加するのが好ましい。

本発明における物理的破碎処理とは、超音波による破碎、乳化分散機、高圧ホモジナイザーやミル等による破碎が挙げられる。上記高圧ホモジナイザーとしては特に限定されないが、例えば、独国APV・ゴーリン社製のマントンゴーリン、デンマークAPVラニー社製のミニラボ、米国Microfluidics社製のマイクロフルイタイザー等を用いることができる。上記ミルとしては特に限定されないが、例えば、スイスWilly A. Bachofen社製のダイノミル等を用いることができる。上記乳化分散機としては特に限定されないが、例えば、英国シルバーソン社製シルバーソンミキサー、日本国エムテック社製クリアーミックス、日本国エバラ社製エバラマイルダー等を用いることができる。アルカリ処理により菌体内より溶出し、主に粘度の上昇の原因となる核酸を効率よく破碎し、かつ、菌体細胞壁や細胞膜や不溶性蛋白質などのポリマー以外の不溶性物質を十分に分散できるものであればこれらに限定されるものではない。また、これらのうち2種類以上の破碎機を同時または順次用いることにより更にポリマーの純度を向上させることができる。

上記物理的破碎処理は、上記懸濁液を攪拌しながら行ってもよい。攪拌を行うための手段としては特に限定されず、通常の機械的攪拌を行える手段であればよい。

本発明においては、PHA含有微生物菌体の懸濁液の物理的破碎処理を、前記懸濁液にアルカリを連続的又は断続的に添加しながら行う。アルカリ処理によっ



て、微生物菌体から P H A と一緒に核酸や菌体細胞壁、細胞膜、不溶性蛋白質などの不溶性物質が流出する。この時、物理的破碎処理を行うことで菌体を完全に破碎し、流出成分を細分化し、粘度の上昇を防ぐとともに、不溶性物質のアルカリ可溶化を進め、P H A の収率を向上させることが可能となる。

- 5      本発明においては、物理的破碎処理とアルカリ添加は同時に行ってもよいし、物理的破碎処理のみを開始した後、アルカリ添加を開始してもよいし、物理的破碎処理とアルカリ添加を交互に行ってもよいし、物理的破碎処理とアルカリ添加を行った後、物理的破碎処理のみをさらに続行してもよい。

- 10      本発明においては、上記アルカリ添加時に上記懸濁液の p H をコントロールすることが好ましい。より好ましくは p H 9 以上、更に好ましくは p H 10 以上にコントロールする。また、より好ましくは 13.5 以下、更に好ましくは 13 以下にコントロールする。p H が 13.5 を超えると P H A の分解が激しい場合があり、p H が 9 未満では P H A の分離効果が低くなる場合がある。コントロールする p H の上下幅としては設定値の上下それぞれ 1 以内が好ましく、更に好ましくは上下それぞれ 0.5 以内である。

15      本発明においては、上記懸濁液の p H をコントロールしながらアルカリを連続的あるいは断続的に添加するのが好ましい。

- 20      本発明者等は、微生物菌体からの P H A の分離精製において、微生物菌体に対して一度にアルカリを添加する従来の方法では、添加直後は一旦高濃度のアルカリが P H A と接触することになり P H A の低分子化が起きたり、反応が進むにつれアルカリが消費されて p H が低下し効率的な抽出を最後まで行えないことを経験した。また、微生物菌体に対してある規定量のアルカリを添加する方法では、微生物菌体懸濁液に含まれる培養液成分などが酸性物質の場合にはそれと反応したり、緩衝状態となったりして、目的を達成しないことも経験した。それに対し、
- 25      本発明の好ましい方法では、p H をアルカリにコントロールするために連続的あるいは断続的にアルカリを添加するので、不溶物を効果的に溶解でき効率的な P H A の分離が行える。また、アルカリの絶対量ではなく p H によって適宜アルカリの添加量は調整されるので、微生物の培養条件や培養後から菌体破碎までに経過した時間、あるいはその微生物菌体懸濁液中の副成分の影響を受けることなく、

再現性のある結果を得ることが可能である。

pHコントロールの点においても、上記懸濁液の物理的破碎処理を、上記懸濁液にアルカリを添加しながら行うことは必要である。物理的破碎処理時にアルカリ添加を行わない場合には、上述したように菌体懸濁液の粘度が上昇し、攪拌が困難となりpHのコントロールを行うことが出来なくなる。従って、添加したアルカリの濃度分布が生じ、アルカリ濃度の高い部分が存在することで、PHAの低分子化が引き起こされることになる。

本発明においては、PHA含有微生物菌体からPHAを分離する工程において、従来のように、物理的破碎処理とアルカリ添加を高温で実施する必要はない。むしろ、アルカリ状態における高温処理はPHAの低分子化を引き起こす要因となるため、好ましくない。本発明における物理的破碎処理とアルカリ添加の好ましい温度条件は、50℃以下であり、より好ましくは40℃以下であり、さらに好ましくは40℃未満である。下限は20℃以上が好ましく、25℃以上がより好ましい。

図1(a)および(b)は、本発明のPHAの分離精製を実施するための微生物菌体を破碎する装置の一例の概略図である。勿論本発明はこれら装置例に限定されるものではない。

符号1は全体で本発明の菌体破碎装置を示している。図1(a)および(b)における符号6はアルカリの薬剤を貯留するためのpH調整剤貯留槽であり、該pH調整剤貯留槽6内の薬剤が、ポンプ4によって管路5を介して菌体破碎槽11に供給され、菌体破碎槽11内の微生物懸濁液のpHを調整する。さらに、菌体破碎槽11にはpH調整剤貯留槽6より供給されたpH調整剤を、菌体破碎槽11内の菌体懸濁液に均一に攪拌混合するための攪拌装置2が付設されている。また、菌体破碎槽11には、菌体破碎槽11内の菌体懸濁液のpHを検知して、所定のpHとなるようにポンプ4からの供給量を制御するために、pH計7とpH検知制御装置から構成されるpH検知制御手段が付設されている。

図1(a)において、菌体破碎槽11内の菌体懸濁液は、ポンプ10を介して破碎装置9に供給され、該破碎装置9により微生物菌体から溶出した粘度の上昇の原因となる核酸を効率よく破碎し、管路8を介して菌体破碎槽11内へ供給す

るようになっている。それによって菌体破碎槽 11 内の菌体懸濁液の粘度が低下し、攪拌装置 2 によって菌体懸濁液が均一となり、菌体懸濁液の pH を厳密に調整できるようになっている。

- 図 1 (b) においては、破碎装置 12 は菌体破碎槽 11 内に付設されており、
- 5 該破碎槽 11 内で該破碎装置 12 により微生物菌体から溶出した粘度の上昇の原因となる核酸を効率よく破碎するようになっている。また、破碎装置 12 が核酸の破碎を行うと同時に、該菌体懸濁液を均一に攪拌する能力を有するものであるならば、(b) における攪拌装置 2 は省略することが出来る。

- 本発明の製造方法によって得られた PHA は、そのままでも高純度であるが、
- 10 目的に応じて、公知の精製方法、例えば、リゾチーム等の溶菌酵素（特公平 4-61638 号）、トリプシンやプロナーゼ等の蛋白質分解酵素（特開平 5-336982 号）、過酸化水素等の過酸化物（特表平 8-502415 号）等を作用させる方法により、更にポリマー純度を向上させることができる。

## 15 図面の簡単な説明

図 1 (a) および (b) は、本発明の PHA の製造方法を実施するための微生物菌体を破碎する装置の一例の概略図である。

発明を実施するための最良の形態

- 20 本実施例で用いた微生物は、アエロモナス・キャビエ由来の PHA 合成酵素群遺伝子を導入したアルカリゲネス・ユウトロファス AC32（寄託については上記を参照）である。これを、J. Bacteriol., 179, 4821-4830 頁（1997）に記載の方法で培養し、平均分子量 100 万のポリ（D-3-ヒドロキシブチレート-co-D-3-ヒドロキシヘキサノエート）〔以下 p（3HB-co-3HH）と略称する〕を約 60 wt % 含有した菌体を得た。
- 25 次にこれを遠心（5000 rpm, 10 min）によって培養液から分離し、このペースト状菌体に水を加えて 50 g 菌体/l の水性懸濁液とした。この水性懸濁液を用いて、以下に示す実施例を行ったが、本発明はこれらの実施例等によりなんら限定されるものではない。

菌体から分離して得られた p (3HB-co-3HH) の純度は、以下のよう  
にして決定した。菌体より分離して得られた沈殿物 10mg を、クロロホルム 1  
ml に溶解したのち、メタノール 0.85ml と濃硫酸 0.25ml を加えて 1  
00℃ で 140 分間処理した。これを冷却後、硫酸アンモニア飽和水溶液 0.5  
5 ml を加えて激しく攪拌して静置し、下層部をキャピラリーガスクロマトグラフ  
ィーにて分析して、分離物中の p (3HB-co-3HH) の純度を求めた。

菌体から分離して得られた p (3HB-co-3HH) の分子量は、菌体より  
分離して得られた沈殿物 10mg を、クロロホルム 1ml に溶解したのち、不溶  
物を濾過により除いた。この溶液を東ソー社製 TSK-GEL GMHXL (7.  
10 8 x 300mm、2 本連結) を装着した SHIMADZU 社製 GPC システムを  
用いクロロホルムを移動相として分析した。

#### (実施例 1)

p (3HB-co-3HH) 含有菌体の該懸濁液 500ml を作成し、pH 電  
15 極とシルバーソンミキサーを装着した 1L の反応容器に入れ 35℃ に保温した。  
pH 電極は丸菱バイオエンジニアリング社製ラボコントローラー MDL-6C 型に接続し、  
該懸濁液の pH が設定値以下になるとペリスタポンプが作動し水酸化ナトリウム  
水溶液が設定値に達するまで該懸濁液内に入るように設定した。これは、図 1 の  
(b) タイプの菌体破碎装置に相当する。シルバーソンミキサーの回転数を 30  
20 00 回転に設定し、ラボコントローラーの pH を 11.8 に設定し 2 時間攪拌を  
行った (この間 1 規定の水酸化ナトリウム水溶液 40ml を必要とした)。処理  
後の懸濁液を遠心分離 (3000rpm、10min) して沈殿物を得た。沈殿  
物は水で 1 回、メタノールで 2 回洗浄し減圧下に乾燥し、p (3HB-co-3  
HH) の粉体を得た。この p (3HB-co-3HH) 粉体の純度は 92% と高  
25 純度であり、平均分子量は 87 万であった。

#### (実施例 2)

該懸濁液の pH の調整を炭酸ナトリウム水溶液で行うこと、および pH の設定  
値を 11.0 に設定した以外は、実施例 1 と同様にして操作を行った。その結果、

得られた p ( 3 H B - c o - 3 H H ) の粉体の純度は 9 1 % と高純度であり、平均分子量は 8 9 万であった。

(実施例 3)

- 5 実施例 1 と同様にラボコントローラーの p H を 1 1 . 8 に設定し 1 時間攪拌を行った。処理後の懸濁液を独国 A P V ・ ゴーリン社製のマントンゴーリンに通して 7 0 0 0 p s i で更に物理的破碎を行った。処理後の懸濁液を遠心分離 ( 3 0 0 0 r p m 、 1 0 m i n ) して沈殿物を得た。沈殿物は水で 1 回、メタノールで 2 回洗浄し減圧下に乾燥し p ( 3 H B - c o - 3 H H ) の粉体を得た。この p (
- 10 3 H B - c o - 3 H H ) 粉体の純度は 9 9 % と非常に高純度であり、平均分子量は 8 7 万であった。

(比較例 1)

- 実施例 1 においてシルバーソンミキサーの代わりにメカニカルスターラー ( 1
- 15 0 0 回転) を用いて攪拌を行った以外は同様の操作を行った。上記メカニカルスターラーは懸濁液の攪拌のみを行うものであり、物理的破碎を行い得るものではない。その結果、アルカリを添加すると懸濁液は粘重となり攪拌することが出来なくなり、正常な p H を測定することが出来なくなった。懸濁液を遠心分離 ( 1 5 0 0 0 r p m 、 1 0 m i n ) したが沈殿物を得ることは出来なかった。

20

(比較例 2)

- 実施例 1 においてラボコントローラーで p H の調整を行わず 1 規定の水酸化ナトリウム水溶液 ( 4 0 m l ) を一度に加えてシルバーソンミキサーで 2 時間攪拌を行った以外は同様の操作を行った。その結果、得られた p ( 3 H B - c o - 3
- 25 H H ) 粉体の純度は 9 0 % と高純度であったが、平均分子量は 3 0 万で低分子化が激しかった。

(比較例 3)

特開平 7 - 3 1 4 8 7 号記載の実施例の条件でアルカリ処理を行った。すなわ

ち、p (3HB-co-3HH) 含有菌体を40 g/lとなるように該懸濁液500 mlを作成し、0.1 Mの水酸化ナトリウム水溶液で4 mMおよび8 mMに調整し80℃で1時間加熱攪拌した。処理後の懸濁液を室温まで冷却後、遠心分離して沈殿物を得ようとしたが、実施例記載の2700 rpmでは沈殿物が得られなかった。そこで、該懸濁液と等量のメタノールを加えて8000 rpmで30分間遠心分離を行い沈殿物を得た。沈殿物は水で1回、メタノールで2回洗浄し減圧下に乾燥し、p (3HB-co-3HH) の粉体を得た。このp (3HB-co-3HH) 粉体の純度は、アルカリ濃度が4 mMおよび8 mMの時、それぞれ72%、70%であり、平均分子量はそれぞれ87万、65万であった。この結果、この方法により得られるp (3HB-co-3HH) 粉体の純度は低く、また、8 mMの条件ではポリマーの低分子化が激しいことが判明した。

#### 産業上の利用可能性

本発明のPHAの分離精製方法は、極めて簡便な分離精製方法によって、高純度のPHAを得ることが可能である。この方法により懸濁液のpHを精密に制御でき、PHAの深刻な分子量低下を招くことなく、収率良く高純度のPHAを得ることができる。従って本発明は微生物によるPHAの工業的生産の効率向上およびコストの低減に大きく寄与するものである。

## 請求の範囲

1. ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸を含有する微生物菌体の懸濁液の物理的  
破碎処理を、前記懸濁液にアルカリを連続的又は断続的に添加しながら行った後、  
5 ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸を分離することを特徴とする、ポリ-3-ヒド  
ロキシアルカン酸の製造方法。
2. アルカリの添加は、懸濁液のpHをコントロールしながら行う請求の範囲  
第1項記載の製造方法。
- 10 3. 懸濁液のpHを9～13.5の間にコントロールする請求の範囲第2項記  
載の製造方法。
4. 懸濁液の物理的破碎処理は、前記懸濁液の攪拌下で行う請求の範囲第1～  
15 3項のいずれか1項に記載の製造方法。
5. 懸濁液の物理的破碎処理は、20℃以上40℃未満の温度で行う請求の範  
囲第1～4項のいずれか1項に記載の製造方法。
- 20 6. ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸が、D-3-ヒドロキシヘキサノエート  
(3HH)と他の3-ヒドロキシアルカン酸との共重合体である請求の範囲第1  
～5項のいずれか1項に記載の製造方法。
7. ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸が、D-3-ヒドロキシブチレート(3  
25 HB)とD-3-ヒドロキシヘキサノエート(3HH)との2成分共重合体、また  
は、D-3-ヒドロキシブチレート(3HB)とD-3-ヒドロキシバレレー  
ト(3HV)とD-3-ヒドロキシヘキサノエート(3HH)との3成分共重合  
体である請求の範囲第6項記載の製造方法。

8. ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸を含有する微生物が、アエロモナス・キャビエである請求の範囲第1～7項のいずれか1項に記載の製造方法。

9. ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸を含有する微生物が、アエロモナス・キャビエ由来のポリ-3-ヒドロキシアルカン酸合成酵素群遺伝子を導入された菌株である請求の範囲第1～8項のいずれか1項に記載の製造方法。

10

15

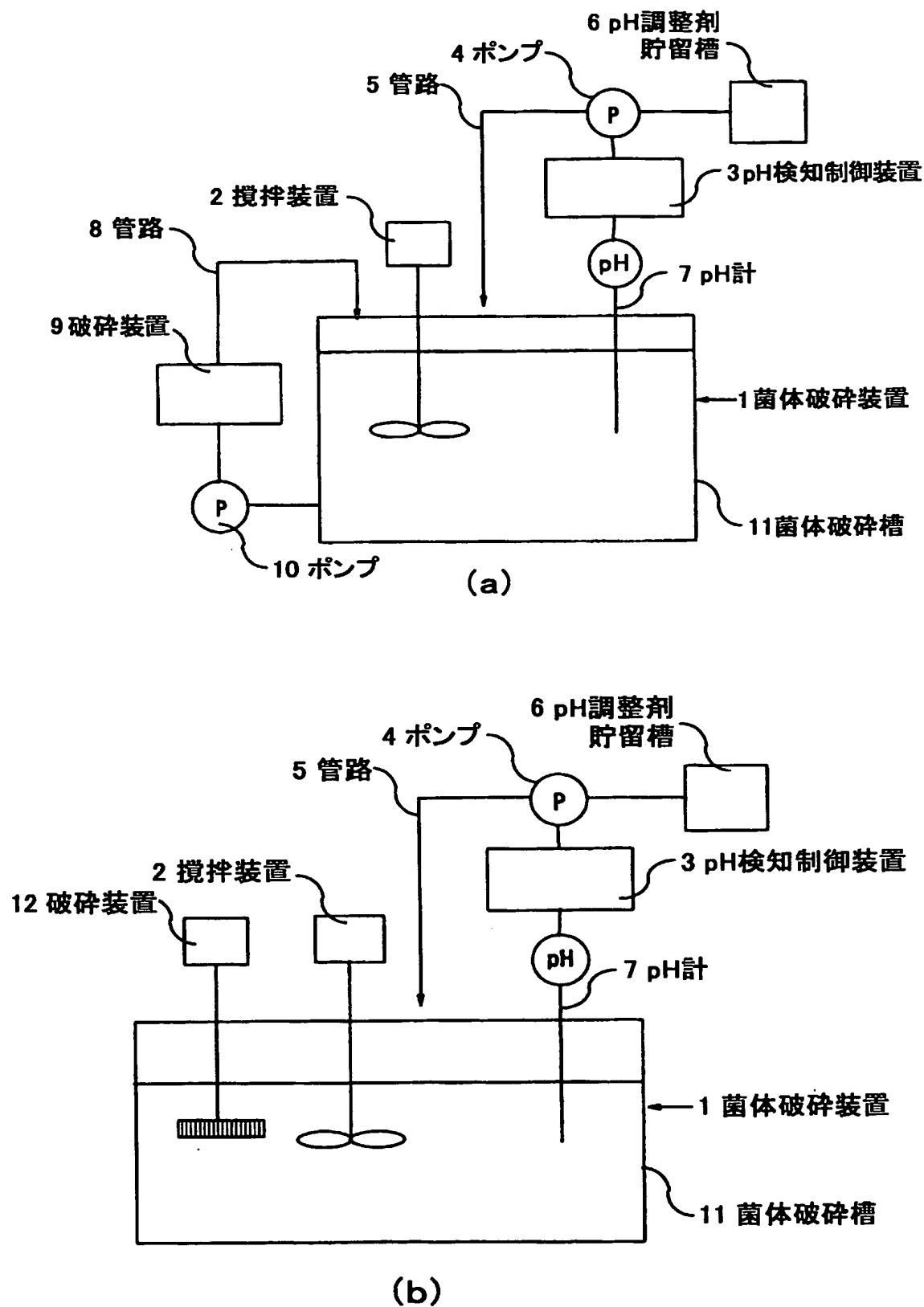
20

25



1/1

図 1



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP03/05323

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C12P7/62, C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12P7/62, C12N15/09, C08G63/00-64/42

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA (STN), REGISTRY (STN), BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG),  
JSTPLUS FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> <u>Y</u> A	JP 7-31489 A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 03 February, 1995 (03.02.95), Claim 1; Par. No. [0013]; example 1 (Family: none)	<u>1, 2, 4, 6, 7</u> <u>8, 9</u> 3, 5
Y	JP 2001-46094 A (Kaneka Corp.), 20 February, 2001 (20.02.01), Claim 3 (Family: none)	8, 9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
17 June, 2003 (17.06.03)

Date of mailing of the international search report  
01 July, 2003 (01.07.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12P7/62, C12N15/09

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12P7/62, C12N15/09, C08G63/00-64/42

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
CA (STN), REGISTRY (STN), BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JSTPLUS ファイル (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y A	JP 7-31489 A (旭化成工業株式会社) 1995. 02. 03 (ファミリーなし) 請求項 1、段落【0013】の実施例 1 参照	1, 2, 4, 6, 7 8, 9 3, 5
Y	JP 2001-46094 A (鐘淵化学工業株式会社) 2001. 02. 20 (ファミリーなし) 請求項 3 参照	8, 9

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 06. 03

国際調査報告の発送日

01.07.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

印

4B

3037

電話番号 03-3581-1101 内線 3488